

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-9424

(43)公開日 平成6年(1994)1月18日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/02		8314-4C		
9/08	U	7329-4C		
37/24		8314-4C		
37/66	H	8314-4C		
47/26	E	7433-4C		

審査請求 未請求 請求項の数10(全 16 頁)

(21)出願番号 特願平5-84602

(22)出願日 平成5年(1993)4月12日

(31)優先権主張番号 特願平4-97947

(32)優先日 平4(1992)4月17日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 猪狩 康孝

兵庫県神戸市東灘区本山南町5丁目4番25-503号

(72)発明者 山田 稔

兵庫県川西市湯山台1丁目1番8号

(72)発明者 武富 滋久

大阪府池田市鉢塚3丁目11番11号

(74)代理人 弁理士 岩田 弘 (外5名)

(54)【発明の名称】 経粘膜用製剤

(57)【要約】

【目的】生理活性ペプチドまたは蛋白質の経粘膜用製剤を提供する。

【構成】生理活性ペプチドまたは蛋白質とシチジンヌクレオチド誘導体とを含有する製剤を製造した。

【効果】上記製剤化によって通常では粘膜吸収されにくい生理活性ペプチドまたは蛋白質であっても粘膜からの吸収が良好である。従って、患者への苦痛を伴う注射ではなく鼻粘膜、膣粘膜、消化管粘膜などの粘膜に自己投与できることから、長期間連投が必要な生理活性ペプチドまたは蛋白質の投与用製剤として極めて有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】生理活性を有するペプチドまたは蛋白質とシチジンスクレオチド誘導体とを含有する経粘膜用製剤。

【請求項2】生理活性を有するペプチドまたは蛋白質が抗生物質、増血剤、感染症治療剤、抗痲呆剤、抗ウイルス剤、抗腫瘍剤、解熱剤、鎮痛剤、消炎剤、抗潰瘍剤、抗アレルギー剤、抗鬱剤、向精神薬、強心剤、不整脈治療剤、血管拡張剤、降圧剤、糖尿病治療剤、抗凝血剤、コレステロール低下剤、骨粗しょう症治療剤、ホルモン

剤またはワクチンである請求項1記載の経粘膜用製剤。  
【請求項3】生理活性を有するペプチドまたは蛋白質がサイトカイン、ペプチドホルモン、成長因子、心臓血管系に作用する因子、細胞接着因子、中枢および末梢神経系に作用する因子、体液電解質および血液有機物質に作用する因子、骨および骨格に作用する因子、消化器系に作用する因子、腎および泌尿器系に作用する因子、結合組織および皮膚に作用する因子、感覚器官に作用する因子、免疫系に作用する因子、呼吸器系に作用する因子、生殖器系に作用する因子または酵素である請求項1記載の経粘膜用製剤。

【請求項4】サイトカインがインターフェロンまたはインターロイキンである請求項3記載の経粘膜用製剤。

【請求項5】ペプチドホルモンがインスリン、成長ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、副腎皮質ホルモンまたは黄体形成ホルモンである請求項3記載の経粘膜用製剤。

【請求項6】骨および骨格に作用する因子が副甲状腺ホルモンまたはその活性フラグメントである請求項3記載の経粘膜用製剤。

【請求項7】シチジンスクレオチド誘導体が、シチジモノー、ジーもしくはトリリン酸であり、リン酸部分の酸素原子が硫黄もしくは窒素原子で置換されているかまたは低級アルキル、低級アルコキシもしくはアミド誘導体で置換されていてもよい請求項1記載の経粘膜用製剤。

【請求項8】生理活性を有するペプチドまたは蛋白質とシチジン誘導体の配合割合が10,000:1から1:10,000(w/w)である請求項1記載の経粘膜用製剤。

【請求項9】シチジン誘導体を0.01から24%(w/w)含有する水溶液である請求項1記載の経粘膜用製剤。

【請求項10】経鼻、経消化器、経肺または経腔投与製剤である請求項1記載の経粘膜用製剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は生理活性ペプチドまたは蛋白質を含有する経粘膜用製剤に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】生命活動を維持するためにホルモンあるいはサイトカインなどのペプチドが多種多様かつ重要な働きを生体内でおこなっていることが近年明らかになってきた。また、最近の合成技術、遺伝子工学の進歩により天然に存在するペプチドあるいは蛋白質もしくはこれらのアミノ酸組成を変化させたものが、純粋にかつ大量に生産されるようになり医薬品としての応用が期待されている。ところが、一般的にこのような生理活性ペプチドあるいは蛋白質は胃腸管内で消化液によって分解されたり、あるいは消化管壁の酵素により加水分解を受けることが知られており、また吸収も悪いことが知られている。従って充分な薬効を期待するためにはこれらの生理活性ペプチドあるいは蛋白質の投与法は通常、経口投与ではなく注射による投与が行なわれているが、患者に与える苦痛は大きく、また自己投与が出来ないことも患者には大きな負担であり、特に連続投与時において問題である。最近、このような生理活性ペプチドあるいは蛋白質を簡便に投与する方法として鼻粘膜、消化管粘膜あるいは腔粘膜からこれらの生理活性ペプチド等を吸収させる経粘膜投与法が提案されている。この場合、カルシトニン、インスリン、副甲状腺ホルモン(PTH)などの分子量の大きいペプチドあるいは蛋白質はそのまま単に投与しても吸収され難いため、吸収促進剤を含有させることが行なわれている。このような製剤としては、次のようなものが知られている。

【0003】特開昭58-189118号公報には生理活性を有するポリペプチドと粘膜吸収促進剤としてシクロデキストリンを含有する経鼻投与製剤の技術が開示されている。特開昭59-89619号公報、および特開昭59-130820号公報には両性、カチオン性などのイオン性界面活性剤、または非イオン性界面活性剤が吸収促進剤として用いられ、その中でも非イオン性であるポリオキシエチレンラウリルエーテルのようなエーテル型界面活性剤の吸収促進効果が特にすぐれていることが開示されている。しかしながら、このエーテル型界面活性剤は鼻粘膜を破壊し、これにより内部への薬物透過機能を発揮するもので、組織障害性を有しており、そのまま実用化するには問題があるといわれている。特開昭59-89619号公報、特開昭59-130820号公報、特開昭61-194034号公報、特開昭64-50823号公報、特開平1-501550号公報および特開平2-503915号公報には例えばベンザルコニウムクロライド、あるいは胆汁酸塩、あるいは燐脂質などの表面活性剤を吸収促進剤として含む鼻腔内投与用医薬組成物の技術が開示されているが、粘膜への刺激はさけられず長期に渡る連続投与は難しいといわれている。

【0004】特開昭61-118325号公報には塩基性および/または中性アミノ酸を、特開昭61-126034号公報にはアルドースを、特開昭61-2675

28号公報にはポリエチレングリコール400を、そして特開昭63-39822号公報には蔗糖脂肪酸エステルをそれぞれ吸収促進剤として含有するカルシトニン経鼻剤の技術が開示されている。しかしながら、これらの吸収促進剤についても粘膜障害性があることが多い。

【0005】特開平1-501550号公報にはフォスファチジルコリンおよびフォスファチジルエタノールアミンなどの磷脂質の誘導体を吸収促進剤として含有するインスリンなどのポリペプチドの鼻腔内投与用製剤の技術が開示されている。また、特開平2-503915号公報にはリゾレシチン、リゾフォスファチジルエタノールアミン、リゾフォスファチド酸等を界面活性剤として含有する技術が開示されている。これらは生体内に存在しかつ生体で代謝されるものであるが、界面活性剤の一種であるので刺激性が懸念される（スーザン、チャンドラーら、インターナショナル ジャーナル オブ ファーマシューティクス、76巻、61-70ページ、1991年）。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、生理活性ペプチドあるいは蛋白質を鼻粘膜、消化管粘膜、膈粘膜等あるいは肺粘膜から、吸収良くしかも粘膜に障害性が無い経粘膜製剤を提供しようとするものである。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決するため鋭意研究をおこなった結果、シチジヌクレオチド誘導体と生理活性ペプチドとを含有する製剤を経鼻あるいは経膈投与したところ、該ペプチドの粘膜よりの吸収が著しく促進されることを見だし、さらに鋭意研究をおこなった結果本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は生理活性を有するペプチドまたは蛋白質とシチジヌクレオチド誘導体とを含有する経粘膜用製剤である。

【0008】本発明における生理活性を有するペプチドまたは蛋白質としては、たとえば抗生物質、増血剤、感染症治療剤、抗痙攣剤、抗ウィルス剤、抗腫瘍剤、解熱剤、鎮痛剤、消炎剤、抗潰瘍剤、抗アレルギー剤、抗鬱剤、向精神薬、強心剤、不整脈治療剤、血管拡張剤、降圧利尿剤などの降圧剤、糖尿病治療剤、抗凝血剤、コレステロール低下剤、骨粗しょう症治療剤、ホルモン剤、ワクチンなどとして用いられるものが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0009】本発明においては、生理活性を有するペプチドあるいは蛋白質としては、2個以上のアミノ酸残基から構成される生理活性を有するペプチドおよびその誘導体が用いられる。その分子量は約200-20000のものが好ましい対象としてあげられる。さらに好ましくは分子量約200-100000、特に好ましくは分子量約200-50000である。該生理活性ペプチドまたは蛋白質は単独投与で粘膜から吸収されるもので

もよく、吸収されにくいものでもよい。ここでいう吸収されにくいとは、吸収促進剤が存在しないと通常の投与量では治療効果が発現するほどは吸収されないことをいう。また、これらペプチドの作用機作としてアンタゴニスト、アゴニスト、またはこれらの可溶性リセプターおよびそれらの誘導体も挙げられる。また、該ペプチドのアミノ酸構造の一部を変更あるいは追加あるいは削除したミューテイン (mutein) も含まれる。さらに、これらペプチドまたは蛋白質はその活性を有するかぎりこれらのフラグメントも含まれる。また、糖鎖を有するものについてはその構造の異なるものも含まれる。場合によっては、ポリエチレングリコールなどの合成ポリマーあるいはヒアルロン酸などの天然ポリマーで修飾されていてもよいし、ガラクトース、マンノース等の任意の糖、あるいは糖鎖あるいは非ペプチド性化合物で修飾されていてもよい。該修飾において付加される物質は任意のレセプター、抗体などへ結合しうるものでもよく、また磷脂質、脂肪酸などの生理活性ペプチドまたは蛋白質に脂溶性を付加するものでもよい。また、本来の薬理活性を発現するのに必要なアミノ酸配列に加えて、例えば任意のレセプター、抗体などへ結合しうるペプチドを付加したハイブリッドペプチドも含まれる。また、複数のペプチドを化学的に結合したものあるいはこれら複数のペプチドの機能を一つのペプチドの中に持つように合成した遺伝子から発現されるペプチドも含む。

【0010】本発明におけるペプチド、蛋白質としては上記のものが挙げられ、以下にその具体例を示すが、これ以外の公知のペプチド、蛋白質を除外するものではない。該ペプチド、蛋白質は天然に生産されるものでもよく、遺伝子組み換えの手法によるものでもよく、また、化学合成によるものでもよい。該ペプチド、蛋白質の例としてはサイトカイン、ペプチドホルモン、成長因子、心臓血管系に作用する因子、細胞接着因子、中枢および末梢神経系に作用する因子、体液電解質および血液有機物質に作用する因子、骨および骨格に作用する因子、消化器系に作用する因子、腎および泌尿器系に作用する因子、結合組織および皮膚に作用する因子、感覚器官に作用する因子、免疫系に作用する因子、呼吸器系に作用する因子、生殖器系に作用する因子、および酵素が挙げられる。該ペプチド、蛋白質としては、なかでも、サイトカイン、ペプチドホルモン、成長因子、心臓血管系に作用する因子、中枢および末梢神経系に作用する因子、体液電解質および血液有機物質に作用する因子、骨および骨格に作用する因子、消化器系に作用する因子、免疫系に作用する因子、呼吸器系に作用する因子、生殖器系に作用する因子、および酵素が好ましい。

【0011】上記サイトカインの例としては、例えばリンフォカイン、モノカイン、造血因子が挙げられる。該リンフォカインとしては、例えばインターフェロン類（例、インターフェロン- $\alpha$ 、- $\beta$ 、- $\gamma$ ）、インター

ロイキン類(例、インターロイキン-2~11)などが挙げられる。該モノカインとしては、例えばインターロイキン-1、腫瘍壊死因子(例、TNF- $\alpha$ 、 $\beta$ )、悪性白血球阻止因子(LIF)などが挙げられる。造血因子の例としては、例えばエリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)などが挙げられる。該造血因子として、さらに血小板新生(増殖)作用を持つ因子が挙げられ、例えば、白血球増殖因子製剤(リユーコプロール、森永乳業)、スロンボポイエチン、血小板増殖刺激因子および巨核球増殖(刺激)因子が挙げられる。骨および骨格に作用する因子の例としては、例えば、骨Glaペプチド、副甲状腺ホルモンまたはその活性フラグメント(オステオスタチン、Endocrinology, 129, 324(1991))、ヒストンH4-関連骨形成増殖ペプチド(OGP, The EMBO Journal, 11, 1867(1992))、またはこれらのミューテイン、またはこれらの誘導体、またはこれらのアナログが挙げられる。上記成長因子の例としては、例えば、神経成長因子類(NGF、NGF-2/NT-3)、上皮細胞増殖因子(EGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)、インスリン様成長因子(IGF)、形質転換成長因子(TGF)、血小板由来細胞成長因子(PDGF)、肝細胞成長因子(HGF)などが挙げられる。

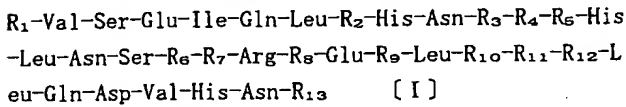
【0012】上記ペプチドホルモンの例としては、例えばインスリン、成長ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、アミリン、オキシトシン、黄体形成ホルモンなどの生殖器に作用する因子またはこれらの誘導体、類縁体、同族体などが挙げられる。該LH-RHの類縁体としては公知のものが挙げられるが、例えば米国特許第4008209号公報、同4086219号公報、同4124577号公報、同4317815号公報、同5110904号公報に記載されたものが挙げられる。心臓血管系に作用する因子としては血圧、動脈硬化などをコントロールする因子、例えばエンドセリン、エンドセリンインヒビター、エンドセリンアンタゴニスト(例えばヨーロッパ特許公開436189号公報、同457195号公報、同496452号公報、特開平3-94692号公報、同130299号公報に記載)、エンドセリン生成酵素阻害剤、バソプレシン、レニン、アンギオテンシンI、アンギオテンシンII、アンギオテンシンIII、アンギオテンシンIインヒビター、アンギオテンシンII受容体アンタゴニスト、心房ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、抗不整脈ペプチドなどが挙げられる。上記中枢および末梢神経系に作用を持つ因子としては例えば、鎮痛麻酔ペプチド(例、エンケファリン、エンドルフィン、キョートルフィン)、ニューロトロピックファクター(NTF)、カルシトニン遺伝子関連ペプチド

(CGRP)、アデニレートサイクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)、甲状腺ホルモン放出ホルモン(TRH)、TRHの塩、その誘導体(特開昭50-121273(米国特許No. 3959247)、特開昭52-116465(米国特許No. 4100152))、ニューロテンシンなどが挙げられる。消化器系に作用する因子としては、例えばセクレチン、ガストリンなどが挙げられる。

【0013】体液電解質と血液有機物に作用する因子の例としては、例えばカルシトニン、アポプロテインE、ヒルディンなどの血液凝固、プラズマ中コレステロール濃度や金属イオンの濃度をコントロールする因子などが挙げられる。細胞接着因子の例としては、例えば、ラミニンや細胞間接着因子1(ICAM1)などが挙げられる。さらに腎臓および尿路系に作用する因子として、腎臓の機能を制御するもの、具体的には脳由来ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、ウロテンシンなどが挙げられる。また感覚器官に作用する因子の例として、諸器官の感受性を支配する因子、例えばサブスタンスPなどが挙げられる。上述の免疫系に作用する因子として、炎症や悪性新生物を支配する因子や感染性微生物を攻撃する因子、例えば走化性ペプチドやブラディキニンなどが挙げられ、さらにこれには天然に生産され、あるいは化学合成または遺伝子工学の手法で生産され抗原になりうるペプチドあるいは蛋白質、例えば杉花粉あるいはぶたくさ花粉などが挙げられる。これらは単独で、あるいはハプテンに結合された状態であるいはアジュバンドとともに本発明の組成で投与される。上述の呼吸器系に作用する因子の例として、喘息反応を支配する因子などが挙げられる。該ペプチド、蛋白質はさらに天然由来のあるいは遺伝子組み換え法により生産される酵素が含まれてもよく、投与可能な酵素として例えばスーパーオキシドデイスミューターゼ(SOD)、アスパラギナーゼ、カリクレインなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。これらのペプチド、蛋白質には該ポリペプチドの可溶性リセプターをその概念に含む。これらのペプチド、蛋白質にはそれぞれポリエチレングリコールのような合成ポリマー、あるいはコンドロイチン、多糖類のような天然ポリマー、または非ペプチド性物質で化学的に修飾されたものを含んでもよい。ここでいう非ペプチド性物質はリセプターに対するリガンドでもよいし、抗体に対する抗原でもよい。さらに上記のペプチド、蛋白質は複数のペプチドが化学的な方法または遺伝子組み換え技術により結合されたものを含んでもよい。

【0014】さらに本発明におけるペプチドまたは蛋白質としては天然物由来、あるいは遺伝子工学的手法もしくは化学的手法により合成される副甲状腺ホルモン、そのミューテインあるいはこれらの誘導体が挙げられる。さらに該ペプチドのN末端側の34個のアミノ酸からなる活性フラグメントが挙げられる。この例としては平成

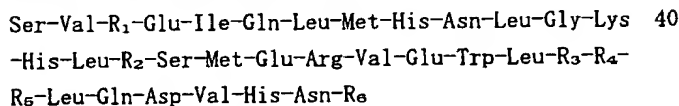
2年特許願第257490号に記載されているヒトPTH(1→34)誘導体、即ち、次の一般式〔I〕で示すペプチドまたはその塩が例示される。



〔式中R<sub>1</sub>はSerまたはAibを、R<sub>2</sub>はMet または天然型の脂溶性アミノ酸を、R<sub>3</sub>はLeu, Ser, Lysまたは芳香族アミノ酸を、R<sub>4</sub>はGly またはD-アミノ酸を、R<sub>5</sub>はLysまたはLeuを、R<sub>6</sub>はMet または天然型の脂溶性アミノ酸を、R<sub>7</sub>はGlu, または塩基性アミノ酸を、R<sub>8</sub>はValまたは塩基性アミノ酸を、R<sub>9</sub>はTrpまたは2-(1,3-ジチオラン-2-イル) Trpを、R<sub>10</sub>はArgまたはHisを、R<sub>11</sub>はLysまたはHisを、R<sub>12</sub>はLys, GlnまたはLeuを、R<sub>13</sub>はPheまたはPhe-NH<sub>2</sub>を示すが、同時にR<sub>1</sub>がSer, R<sub>2</sub>がMet, R<sub>3</sub>がLeu, R<sub>4</sub>がGly, D-AlaまたはD-Pro, R<sub>5</sub>がLys, R<sub>6</sub>がMet, R<sub>7</sub>がGlu, R<sub>8</sub>がVal, R<sub>9</sub>がTrp, R<sub>10</sub>がArg, R<sub>11</sub>がLys, R<sub>12</sub>がLysである場合を除く〕(配列番号: 1)

上記ペプチドにおいてR<sub>2</sub>, R<sub>6</sub>における天然型の脂溶性アミノ酸としては天然(動物、植物または微生物)の蛋白質を構成するアミノ酸のうち脂溶性のものをいい、具体的にはLeu, Ile, Val, PheおよびTrp等が挙げられる。R<sub>3</sub>における芳香族アミノ酸としてはPhe, β-ナフチルAla, TrpおよびTyrなどが挙げられる。R<sub>4</sub>におけるD-アミノ酸としては、D-アミノ酸であれば、特に限定されるものではなく、具体的にはD-Leu, D-Ile, D-Nle, D-Val, D-Ser, D-Ser(But), D-Abu, D-Thr, D-Nva, D-Met, β-ナフチルD-Ala, D-Trp, D-Tyr, D-Lys, D-Lys(Fmoc), D-Phe, D-Asnなどが挙げられるが、一般に中性アミノ酸が好ましく、例えばD-Ser, D-Leu, β-ナフチルD-Ala, D-Trp, D-Asn, D-Tyr等が挙げられる。R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>における塩基性アミノ酸としてはArg, Lys, Asn, His等が挙げられる。これらの置換は一箇所だけではなく、何箇所かの置換の組み合わせも可能であり、特に3箇所までの置換の組み合わせが好まれる。

【0015】さらに、PTH作用を有するペプチドとしては平成4年特許願第63517号明細書に記載されている次の一般式〔II〕で示すヒトPTH(1→34)誘導体またはその塩が例示される。



〔式中R<sub>1</sub>はSerまたは炭素数4以下のD-αアミノ酸を、R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>は水溶性α-アミノ酸を、R<sub>6</sub>はPheまたはPhe NH<sub>2</sub>を示す。(ただし同時にR<sub>1</sub>がSer, R<sub>2</sub>がAsn, R<sub>3</sub>がArgまたはHis, R<sub>4</sub>がLysまたはHis, R<sub>5</sub>がLys, LeuまたはGlnである場合を除く)〕

さらに、WO92/00753号公報に記載のPTH(1→34)誘導体や特開平4-247034号公報に記載のヒトPTHフラグメントも本発明の対象となり得

る。

【0016】本発明でいうシチジンスクレオチド誘導体のシチジンスクレオチドとは、シチジンの糖部分における任意の-OH基が1個以上リン酸化されたものであり、モノ、ジまたはトリリン酸体のいずれであってよい。また、該誘導体とは上記のシチジンスクレオチドのリン酸部位の一ないし複数の酸素原子が他の原子あるいは置換基で置換されているものをいい、ここでいう他の原子としては、例えばイオウ、窒素などが、また置換基としては、低級アルキル、低級アルコキシ、アミドなどが挙げられる。さらに、該誘導体としてグルコースなどの糖、コリンなどの4級アンモニウム化合物がエステル結合しているものが挙げられる。本発明のシチジンスクレオチド誘導体は、生理的に許容しうるものであって、生理活性ペプチドまたは蛋白質を粘膜から吸収させる際に、その吸収を促進させる作用を持つものであればよい。ペプチド、蛋白質が粘膜から吸収される際には、それぞれの性質に応じて様々なルートが考えられる。例えば粘膜を構成する細胞の間隙を経由して血管壁に到達するルート、あるいは受動的あるいは能動的に細胞に取り込まれた後、これをそのまま排出することを繰り返して血管壁に到達するルートなどが考えられる。本発明のシチジンスクレオチド誘導体はペプチド、蛋白質がこれらのルートを通ずるのを促進させてもよいし、また、粘膜局所の血管壁に直接作用することにより吸収を促進させてもよい。また、これに限定されず他のメカニズムによりペプチド、蛋白質の吸収を促進させてもよい。また、本発明のシチジンスクレオチド誘導体はペプチド、蛋白質と相互作用し複合体を形成することにより、吸収促進させてもよい。その具体例としては一般名シチコリン(Citicoline)、化学名シチジンジフォスフェートコリン(Cytidine diphosphate choline)、分子式C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub>で表される物質が挙げられる。本物質は脳外傷時の磷脂質代謝異常と意識及び脳の機能並びに病態変化に関する生化学的、薬理学的研究から開発された薬物であり、臨床的に脳損傷に伴う意識障害、脳梗塞急性期意識障害、脳卒中片麻痺、パーキンソン病に対して有用性が認められている(ニコリンH注射液使用説明書、武田薬品)。また、急性肝炎、慢性再発性肝炎の急性増悪期、または術後の急性肝炎に対して蛋白分解酵素阻害剤との併用療法にも用いられている。本化合物はレシチンの分解を抑制し、磷脂質生合成を促進することにより磷脂質代謝を改善することが知られている。多くの臨床使用実績から、その安全性は確立されている。従って該化合物と生理活性ペプチドまたは蛋白質とを含有する医薬組成物の鼻粘膜、口腔粘膜等の粘膜から安全に投与することができる。

【0017】生理活性ペプチドまたは蛋白質対シチジンスクレオチド誘導体の重量比は、好ましくは10000:0:1~1:100000、さらに好ましくは1000

0:1~1:10000、より好ましくは100:1~1:10000、もっとも好ましくは1:1~1:10000である。また、例えば、液剤の場合にはシチジンスクレオチド誘導体の配合濃度は約0.01~25%

(w/v)、好ましくは0.1~15% (w/v)、さらに好ましくは0.1~10% (w/v)、もっと好ましくは0.1~5% (w/v) である。その他の剤型の場合には、本発明におけるシチジンスクレオチド誘導体の吸収促進効果が発揮され、かつ当該製剤の性質を損なわないように前記の配合割合で配合される。本発明の製剤のpHは生理活性ペプチドまたは蛋白質の活性に大きな影響を与えずに、生理的に許容できる範囲内のpHが用いられる。好ましくは約pH2~pH10である。さらに好ましくは約pH3~pH9である。特に好ましくは約pH3.5~pH8である。生理活性ペプチドまたは蛋白質の種類によっては中性付近よりも酸性側、あるいは塩基性側のpHが該ペプチドの安定性あるいは吸収性を高めるために好まれる場合もある。本発明の製剤が液剤である場合の張度は0.9% (w/v) の生理食塩水が示す張度を基準にして決定されるが、適用する粘膜に不可逆的な変化を引き起こさない張度になるように調整される。0.9% (w/v) の生理食塩水が示す張度の1/3から3倍、好ましくは1/2から2倍、特に好ましくは3/4倍から1.7倍の張度に調整される。

【0018】本発明の経粘膜製剤の製造において、シチジンスクレオチド誘導体は直接に生理活性ペプチドまたは蛋白質と配合してもよく、また、親水性高分子中、生分解性高分子中あるいは他の高分子中に配合しておいてから生理活性ペプチドまたは蛋白質と配合してもよい。場合によっては、有形の製剤の粘膜などへの適用面にコーティングまたは適用面の表面相に含ませておいてもよい。要は、生理活性ペプチドまたは蛋白質とシチジンスクレオチド誘導体とが共存下で粘膜に投与される形態であればよい。

【0019】本発明の製剤には上記2成分に加えて、製剤を構成する上において許容される各種の添加物、あるいは必要に応じてこれらの物質を分散させるための基剤が一般に含まれる。該添加物として、例えばpH調節剤としてアルギニン、水酸化ナトリウム、グリシン、塩酸、クエン酸、局所麻酔剤としてベンジルアルコール、等張化剤として食塩、マンニトール、ソルビトール、吸着防止剤としてトイーン80 (Tween 80)、溶解補助剤としてシクロデキストリン類またはその誘導体、安定化剤として血清アルブミン、あるいは還元剤としてグルタチオンなどが挙げられるがこれらに限定されない。また粘膜あるいは投与雰囲気下には各種の蛋白分解酵素が存在するため、本製剤には必要に応じて蛋白分解酵素阻害剤を配合することにより、投与対象の生理活性ペプチドまたは蛋白質の分解を抑制し、バイオアベイラビリティをさらに向上させることが可能になる場合もある。

該蛋白分解酵素阻害剤としては、例えばメシル酸ガベキサート、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、アプロチニン、ロイペプシン、 $\alpha$ 2マクログロブリン、ペプスタチン、卵白または大豆トリプシンインヒビターなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらは1種または2種以上が使用される。該蛋白分解酵素阻害剤は、予めペプチドと配合してもよく、また、親水性高分子中に配合しておいてもよく、また、有形の製剤の粘膜などへの適用面にコーティングまたは適用面の表面相に含ませておいてもよい。

【0020】本発明の製剤中には、生理活性ペプチドまたは蛋白質の吸収と拡散をさらに促進するために吸収助剤を添加してもよい。該吸収助剤は製剤上許容されるものであるならばいずれでもよいが、例えばサリチル酸ソーダおよびその誘導体 (アセチルサリチル酸、サリチル酸コリン、サリチルアミドなどが挙げられる)、アミノ酸およびその塩 (グリシン、アラニン、フェニルアラニン、プロリン、ヒドロキシプロリンなどのモノアミノカルボン酸、セリンなどのオキシアミノ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸などの酸性アミノ酸、リジンなどの塩基性アミノ酸、これらのアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩などが挙げられる)、N-アセチルアミノ酸 (N-アセチルアラニン、N-アセチルフェニルアラニン、N-アセチルセリン、N-アセチルセリン、N-アセチルグリシン、N-アセチルリジン、N-アセチルグルタミン酸、N-アセチルプロリン、N-アセチルヒドロキシプロリンなどが挙げられる) およびその塩 (アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩)、乳化剤として使用される物質 (オレイル燐酸ソーダ、ラウリル燐酸ソーダ、ラウリル硫酸ナトリウム、ミリスチル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルエステルなどが挙げられる)、カプロン酸、乳酸、リンゴ酸、クエン酸およびそのアルカリ金属塩、ピロリドンカルボン酸、アルキルピロリドンカルボン酸エステル、N-アルキルピロリドン、プロリンアシルエステルなどが挙げられる。該吸収助剤は生理活性ペプチドまたは蛋白質の溶解度を変化させたり、あるいはエマルジョンを形成させるなどのメカニズムが考えられるが、本発明製剤を構成する生理活性ペプチドまたは蛋白質およびその他の配合される物質の組み合わせにより粘膜表面の性質を大幅に変えることなく長期連続投与に適切なものを選択すればよい。本発明における上記各成分はさらに基剤中に分散されていてもよい。

【0021】本発明の製剤における基剤としては親水性化合物が挙げられ、ペプチド、添加物などを分散させる機能を有するものであればよい。該親水性化合物として、その分子量が1千以上、好ましくは1万以上、より好ましくは10万以上である。製剤上許容されるものであればいずれでもよく、代表的なものとしては以下のよう

なものがあるが、これに限定されるものではない。



い。ポリカルボン酸およびその塩類または無水カルボン酸（無水マレイン酸など）と他のモノマー（メチル（メタ）アクリレート、アクリル酸など）との共重合体、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどのビニル系の親水性高分子化合物、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどのセルロース誘導体、キトサン、コラーゲン、アルギン酸ソーダ、ゼラチン、ヒアルロン酸あるいはこれの無毒金属塩などの天然高分子が挙げられる。またポリグリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルなどの合成脂肪酸エステル類が挙げられる。親水性高分子は1種または2種以上を使用することができ、部分結晶化イオン結合、架橋などにより、構造上の成型性を持たせてもよい。これら親水性高分子は座剤、あるいはフィルム状に成型され、腔あるいは直腸などの粘膜に適用されてもよい。また、公知の方法に従い、マイクロカプセル（マイクロスフィア）などの粒子に成型され、鼻、腔、直腸などの消化管粘膜に適応されてもよい。また、粉末あるいは溶液（粘性を持つ場合もある）で粘膜に適応されてもよい。これらの親水性高分子とシチジンヌクレオチド誘導体を組み合わせることによりさらに吸収促進が図られる。

【0022】また、本発明の基剤としては生分解性高分子を用いてもよく、例えばポリ乳酸、ポリ（乳酸-グリコール酸）共重合体、ポリヒドロキシ酪酸、ポリ（ヒドロキシ酪酸-グリコール酸）共重合体、またはこれらの混合物などが代表的なものとして挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの生分解性高分子は座剤、あるいはフィルム状に成型され、腔あるいは直腸などの粘膜に適用されてもよい。また、公知の方法に従いマイクロカプセル（マイクロスフィア）あるいはナノカプセル（ナノスフィア）を作成し、生体に適応可能な分散媒に分散して、鼻、腔、直腸などの消化管粘膜に適用してもよい。また、生理活性ペプチドはこれらの剤型中に公知の方法で分散される。活性ペプチドのこれらの剤型からの放出は、拡散、該生分解性高分子の崩壊、あるいはこれに伴う剤型中の水の通路の形成などが考えられる。また、該生分解性高分子の硝子転移点が体温付近あるいはこれより低い場合には、生体に適用された後に該生分解性高分子が軟化し、拡散速度が増大することによる生理活性ペプチドの剤型からの放出などのメカニズムも考えられる。これらの生分解性高分子とシチジンヌクレオチド誘導体を組み合わせることによりさらに吸収促進が図られる。また、上記以外的高分子を基剤として作製したマイクロカプセル（マイクロスフィア）あるいはナノカプセル（ナノスフィア）中に活性ペプチドを分散させ、生体に適応可能な分散媒に分散して、鼻、腔、直腸などの消化管粘膜に適用してもよい。例えばミシェルら（ジャーナルオブファーマシーアンドファーマコロジー、43、1-5（1991））は

イソブチル-2-シアノアクリレートを用いたナノカプセル中にインスリンを封入し消化管の異なる部位の粘膜に投与することにより血糖降下作用が長時間持続することを報告しており、該ナノカプセルにシチジンヌクレオチド誘導体を組み合わせることによりさらに吸収促進が図られる。上記の高分子は、通常基剤として機能するものであるが、所望とする剤型に応じて、当該製剤の製造用として通常使用される他の基剤を配合することが好ましい。例えば、直腸座剤あるいは腔座剤にあっては、ウイテップゾール、カカオ脂、マクロゴール、プロピレングリコール、グリセリンなどが必要に応じて使用される。

【0023】本発明の製剤には親水性低分子化合物が含まれてもよい。該親水性低分子化合物は水溶性の生理活性ペプチドまたは蛋白質が基剤中を拡散して生体表面に移行し吸収されるための連続的パスを施すものである。このパスはミクロ的でもよいし、製剤全体がこのパスとなり得るものでもよい。該親水性低分子化合物は粘膜や投与雰囲気から水分を吸収し、水溶性活性ペプチドを溶解させるものであればよい。該親水性低分子化合物としては、例えば分子量が10000以下、好ましくは3000以下のものが挙げられ、例えばポリオール系化合物としてシュクロース、マンニトール、ラクトース、L-アラビノース、D-エリスロース、D-リボース、D-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトース、ラルトース、セルビオース、ゲンチビオースなどのオリゴ糖、2糖、単糖類が挙げられる。これ以外のポリオールとしてグリセリンやポリエチレングリコール（平均分子量200-3000）が例示される。親水性低分子化合物の他の例としては、Nメチルピロリドン、アルコール類（例えば、オリゴビニルアルコール、エタノール、エチレングリコール、プロピレングリコールなど）が挙げられる。該親水性低分子化合物は1種あるいは2種以上が用いられる。上記の親水性高分子、生分解性高分子、親水性低分子化合物、吸収助剤、蛋白分解酵素阻害剤、添加物は本発明において用いられる活性ペプチドのアミノ酸組成、立体構造などの差に応じてそれぞれに適したものを選ぶことが好ましい。

【0024】本発明の製剤における生理活性ペプチドまたは蛋白質の配合量としては、該物質の活性および治療量の必要性に応じて選択すればよいが、単位投与組成物中には通常薬用量あるいはバイオアベイラビリティが100%でないこと即ち、投与された活性ペプチドが完全に吸収される訳ではないことを考慮して、多めに配合することが好ましい。また、液剤、エアロゾルあるいは他の投与形態で同一容器から複数回の投与をおこなう場合には、一回あたりの投与量が通常薬用量あるいはそれよりも多めに投与できるようにすることが好ましい。また、投与量は人、家畜などの温血動物の種あるいは体重によって異なることは注意すべきである。



【0025】本発明の製剤の保存は未使用の状態では常温あるいは冷所に保存されるが、好ましくは冷所である。ここでいう常温あるいは冷所とは日本薬局方において定義されるものである。同一容器から複数回投与されるような場合には投与時の汚染を避ける工夫、例えば体液の容器内への逆流を防止するような工夫が必要であるが、さらに冷所保存をすることが好ましい。また、容器内での雑菌の繁殖を防止するため、製薬上許容される防腐剤、抗菌剤などが添加されてもよい。

【0026】本発明の製剤は、粘膜に投与されるがその部位は通常の経粘膜剤と同様である。通常、鼻または腔の粘膜に好ましく投与されるが、直腸、小腸などあるいは口腔粘膜への投与も行なわれる。投与対象の生理活性ペプチドまたは蛋白質の種類あるいは剤型に応じて、またその投与部位により具体的な投与方法を適宜選択すればよい。以下に例を挙げて簡単に説明するが、これらに限定されるものではない。溶液として製剤が作成される場合には、生理活性ペプチドまたは蛋白質を水、生理食塩水などに溶解し、シチジヌクレオチド誘導体を添加したもの、あるいは生理活性ペプチドまたは蛋白質とシチジヌクレオチド誘導体を含む製剤の真空乾燥物あるいは凍結乾燥物を水あるいは生理食塩水で溶解したものを噴霧器、任意の注入器で注入してもよい。また、これにアルギン酸ソーダ、ヒアルロン酸ソーダ、ハイドロキシプロピルセルロースなどを加えることにより粘性を持たせ滞留時間を延長させ得る。また、溶液あるいは粉末などの微粒子として製剤化される場合には、噴霧器を工夫して噴霧後の粒子径を小さくし鼻あるいは口腔から噴霧吸引することにより肺（粘膜）に製剤を到達させることが可能になる（インハレーション）。また、無菌性など注射剤に要求される製剤の条件をクリアする場合には注射による血管内、皮下などへの投与は制限されない。

【0027】投与方法としては、たとえば直腸座剤に成型されたものは肛門から指で挿入され、腔座剤に成型されたものは指あるいは任意のアプリーケーターを使用して腔内に挿入される。ナノカプセルを経口的に投与する場合には通常用いられる経口投与用ゼラチンカプセル内に充填されたり、あるいは該ゼラチンカプセルにエンテリックコーティングを施すことにより胃内ではナノカプセルが放出されず十二指腸以後で該ナノカプセルが放出されるシステムが用いられてもよい。また、該ナノカプセルあるいはこれにエンテリックコーティングを施したナノカプセルに経口投与に用いられる液体、例えば生理食塩水、シロップなどを添加、懸濁して経口投与してもよい。閉経後の女性においては女性ホルモンの分泌が抑制されることから、腔粘膜の厚さが薄くなり、薬物の透過性が高まることが知られている。閉経後の女性に多い疾患、例えば骨粗鬆症などの治療に用いられるカルシトニン、副甲状腺ホルモンあるいはその活性フラグメントあるいはこれらの誘導体などのペプチドの腔投与製剤とし

て本発明の製剤が有利に用いられる。

#### 【0028】

【実施例】以下に参考例と共に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。さらに実験例を挙げて、本発明製剤の効果を示す具体例も合せて示す。

#### 参考例1 PTH部分ペプチド（1-34位）類縁体の合成と精製

本ペプチドの合成はメリフィールドらにより開発されたペプチドの固相合成法（R. B. Merrifield, アドバンシズ イン エンザイモロジー（Adv. Enzymol）32巻、221-296頁 1969年）の変法に順じて行われ、自動ペプチド合成機430A（アプライドバイオシステムズ社）を用いた。保護ペプチド樹脂の合成はアプライドバイオシステムズ社指定のプロトコールを用いた。カルボキシル末端が遊離カルボン酸の誘導体を得る場合には保護アミノ酸-pオキシメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂（ポリスチレン-1%ジビニルベンゼン）を、またカルボキシルアミドの誘導体を得る場合には4-メチルベンズヒドリル樹脂を出発原料とし、これに逐次保護アミノ酸を縮合させた、縮合時に各アミノ酸のα-アミノ基を保護するため、三級ブチルオキシカルボニル（BOC）基を用いた。側官能基保護は次のように行なった。セリンとスレオニンのヒドロキシル基はo-ベンジルエーテルとして、チロシンのヒドロキシル基又はp-プロモベンジルオキシカルボニルエステルとして、グルタミン酸及びアスパラギン酸のカルボキシル基はベンジルエステルとして、ヒスチジンのイミダゾール窒素はベンジルオキシメチルによって、リジンの側鎖アミノ基は2-クロロベンジルオキシカルボニルで、アルギニンのグアニジン官能基はp-トルエンスルホン基で、トリプトファンのインドールイミンはホルミル基で保護した。すべてのアミノ酸は、アプライド・バイオシステムズジャパン社又はバチウム・ケミカルズから入手した。

【0029】樹脂上に全てのアミノ酸を縮合した後、保護ペプチド樹脂を合成機から取り出し、乾燥した。ペプチド樹脂（1g）を、p-クレゾール（1ml）、1,2-エタンジチオール（1ml）、2-メルカプトピリジン（100mg）を含んだ、無水フッ化水素（8ml）と、0℃で2時間反応させた。反応終了後、フッ化水素を留去し、残留物をジエチルエーテルで洗浄し、大部分の混合試薬を除去した。ペプチドを3%酢酸（10ml）で抽出し、濾過により樹脂を除いた。濾液をセファデックスG-25を用いるゲル濾過により精製した。ゲル濾過の条件は、カラムサイズ2.8×60cm、検出波長230もしくは280nm；溶媒、3%酢酸；流速40ml/時間であった。ペプチドを含むフラクションを集めて凍結乾燥し、得られた粉末標品をさらに逆高速液体クロマトグラフィーで精製した。カラムYMC-パック、A-324

ODS (10×250mm) 溶出溶媒A, 0.1%トリフルオロ酢酸-99.9%水; 溶出溶媒B, 0.1%トリフルオロ酢酸-99.9%アセトニトリル; 溶出濃度勾配プログラム、0分(90%A+10%B)、30分(60%A+40%B) (但し必要ならば他の溶出プログラムを用いる事もある。) 溶出速度1.6ml/分、検出波長230または280nm。純粋な目的物を含むピーク画分を集めてバイオラッドAGI×8 (酢酸型、1.8×5cm) のカラムに通し、洗液も集めアセトニトリルを留去した後、凍結乾燥して掲題のペプチドを得た。

#### 【0030】実施例1

参考例1に記載の方法に準じて作成したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの4ミリigramを600マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の90マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液(武田薬品)の90マイクロリットルを加えて混和した。

#### 実施例2

ヒトPTH(アミノ酸84個から成る)(バッケム(Ba chem)社)の4ミリigramを600マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の100マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液(武田薬品)の100マイクロリットルを加えて混和した。

#### 実施例3

参考例1に準じて作成したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメント(固相法で合成)の4ミリigramを600マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の50マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液(武田薬品)の50マイクロリットルを加えて混和した。

#### 実施例4

ヒトPTH(アミノ酸84個から成る)(バッケム(Ba chem)社)の4ミリigramを200マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の50マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液(武田薬品)の50マイクロリットルを加えて混和した。

#### 【0031】実施例5

参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの18.47ミリigramを154マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の5マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液(武田薬品)の50マイクロリットルと注射用生理食塩水を45マイクロリットルを加えて混和した。この内、5マイクロリットルを鼻腔に投与する。

#### 実施例6

参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの18.47ミリigramを154マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の50マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液(武田薬品)の50マイクロリットルを加えて混和した。この内、5マイクロリットルを鼻腔に投与する。

#### 10 実施例7

参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの2.03ミリigramを50.75マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の20マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液(武田薬品)の20マイクロリットルを加えて混和した。

#### 実施例8

20 参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの18.47ミリigramを154マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の5マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液(武田薬品)の50マイクロリットルおよび注射用生理食塩水45マイクロリットルを加えて混和した。

#### 【0032】実施例9

30 参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの18.47ミリigramを154マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の50マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液(武田薬品)の50マイクロリットルを加えて混和した。

#### 実施例10

40 参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの14ミリigramを350マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の50マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液(武田薬品)の25マイクロリットルと注射用生理食塩水25マイクロリットルを加えて混和した。

#### 実施例11

50 参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの14ミリigramを350マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の50マイクロリットルにシチコリン500ミリigram

を2ミリリットル中に含むニコリンH注射液（武田薬品）の10マイクロリットルと注射用生理食塩水40マイクロリットルを加えて混和した。

#### 実施例12

参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの14ミリigramを350マイクロリットルの注射用生理食塩水（扶桑薬品）に溶解した。この溶液の50マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液（武田薬品）の5マイクロリットルと注射用生理食塩水45マイクロリットルを加えて混和した。

#### 【0033】実施例13

参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの7.8ミリigramを195マイクロリットルの注射用生理食塩水（扶桑薬品）に溶解した。この溶液の50マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液（武田薬品）の50マイクロリットルを加えて混和した。

#### 実施例14

300万国単位（約100マイクログラムに相当）のインターフェロンアルファ2aと5ミリigramのヒト血清アルブミンを含むインターフェロンアルファ製剤（キャンフェロンA300：武田薬品）に1ミリリットルの注射用蒸留水を添加して溶解したものを標準として含量を酵素免疫法で決定したインターフェロンアルファ2aの20ミリigramを注射用生理食塩水の0.5ミリリットルで溶解した。この溶液の50マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液（武田薬品）の50マイクロリットルを加えて混和した。

#### 実施例15

16.75ミリigramのヒトインスリン（和光純薬）を155.5マイクロリットルの1/10Mクエン酸緩衝液（pH3.5）に溶解した。この溶液の50マイクロリットルにシチコリン500ミリigramを2ミリリットル中に含むニコリンH注射液（武田薬品）の50マイクロリットルを加えて混和した。

#### 【0034】実験例1

ヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメント（固相法で合成）の4ミリigramを600マイクロリットルの注射用生理食塩水（扶桑薬品）に溶解した（比較製剤1とする）。SD系雄性ラット（8週齢）にペントバルビタール（ネンブタール注射液、大日本製薬）で麻酔を施し、インターナショナルジャーナルオブファーマシューティクス、第7巻、317ページ（1981年）に記載された方法に従い、経鼻投与のための手術を施した後、マイクロピペット

（エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬）で3

0マイクロリットルの容量の実施例1の製剤および比較製剤1をラット鼻腔より直接鼻腔内に投与した。経時的に尾静脈より採血し、ヒトPTHの活性フラグメントの血清中濃度を測定した。血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を〔図1〕に示す。比較製剤1投与群（○）では投与後30分目から血清中濃度が上昇し、投与後6時間目までほぼ一定の値が持続された。一方、シチコリンを含有する実施例1の製剤投与群（●）でも同様に速やかに血清中濃度が上昇するが、その値は比較製剤1投与群に比較して約2倍の値であり、しかもこの高い値が投与後6時間目まで維持されることが判明した。このことはシチコリンを共存させることにより、ヒトPTHの活性フラグメントの鼻粘膜からの吸収が促進されることを示している。

#### 【0035】実験例2

ヒトPTH（アミノ酸84個から成る）の4ミリigramを600マイクロリットルの注射用生理食塩水（扶桑薬品）に溶解した（比較製剤2とする）。SD系雄性ラット（8週齢）にペントバルビタール（ネンブタール注射液、大日本製薬）で麻酔を施し、インターナショナルジャーナルオブファーマシューティクス、第7巻、317ページ（1981年）に記載された方法に従い、経鼻投与のための手術を施した後、マイクロピペット（エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬）で30マイクロリットルの容量の実施例2の製剤および比較製剤2をラット鼻腔より直接鼻腔内に投与した。経時的に尾静脈より採血し、ヒトPTHの血清中濃度を測定した。血清中ヒトPTH濃度の時間推移を〔図2〕に示す。比較製剤2投与群（○）では投与後30分目から血清中濃度が上昇し、投与後6時間目までほぼ一定の値が持続された。一方、シチコリンを含有する実施例2の製剤投与群（●）でも同様に速やかに血清中濃度が上昇するが、その値は比較製剤2投与群に比較して約2倍の値であり、しかもこの高い値が投与後6時間目まで維持されることが判明した。このことはシチコリンを共存させることにより、ヒトPTHの鼻粘膜からの吸収が促進されることを示している。

#### 【0036】実験例3

SD系雌性ラット（7週齢）にペントバルビタール（ネンブタール注射液、大日本製薬）で麻酔を施し、黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログであるリューププロレリンアセテートを約1ミリigram含むポリ（乳酸-グリコール酸）マイクロカプセルを後頭部皮下に投与した。投与翌日から腔分泌物をギムザ染色後鏡検することにより性周期を経時的に観察した。実験に使用したすべてのラットの性周期が発情間期になったことを確認した後、ペントバルビタール（ネンブタール注射液、大日本製薬）で麻酔を施したラットの腔内に実施例3の製剤の10マイクロリットルをマイクロピペット（エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬）で投与した。経時的に尾

静脈より採血し、ヒトPTHフラグメントの血清中濃度を測定した。血清中ヒトPTHフラグメント濃度の時間推移を〔図3〕に示す。シチコリンを共存させることにより、ヒトPTHフラグメントが腔粘膜から吸収されていることを示している。

#### 【0037】実験例4

SD系雌性ラット（7週齢）にペントバルビタール（ネンブタール注射液、大日本製薬）で麻酔を施し、黄体形成ホルモン放出ホルモンアナログであるリュープロレリンアセテートを約1ミリグラム含むポリ（乳酸-グリコール酸）マイクロカプセルを後頭部皮下に投与した。投与翌日から腔分泌物をギムザ染色後鏡検することにより性周期を経時的に観察した。実験に使用したすべてのラットの性周期が発情期間になったことを確認した後、ペントバルビタール（ネンブタール注射液、大日本製薬）で麻酔を施したラットの腔内に実施例4の製剤の10マイクロリットルをマイクロピペット（エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬）で投与した。経時的に尾静脈より採血し、ヒトPTHの血清中濃度を測定した。血清中ヒトPTH濃度の時間推移を〔図4〕に示す。シチコリンを共存させることにより、ヒトPTHが腔粘膜から吸収されていることを示している。

#### 【0038】実験例5

参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの2.03ミリグラムを50.75マイクロリットルの注射用生理食塩水（扶桑薬品）に溶解した。溶液の20マイクロリットルに注射用生理食塩水20マイクロリットルを加えて混和した（比較製剤3とする）。SD系雄性ラット（8週令）にペントバルビタール（ソムノペンチル、ピットマンムーア社）で軽く麻酔を施し（約0.2ミリリットル/ラット）、実施例7の製剤または比較製剤3の5マイクロリットルをそれぞれ直接片側の鼻腔内に投与した（投与量：100マイクログラム/ラット）。投与方法はマイクロピペット（エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬）の専用のチップを鼻腔に注意深く差し込み投与をおこなった。麻酔から回復後（約1時間弱）は飼育ケージ内で自由に水および餌を摂取させた。経時的に尾静脈より採血し、ヒトPTHの活性フラグメントの血清中濃度を測定した。血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を〔図5〕に示す。比較製剤3投与群（○）では、投与直後に小さい吸収のピークがみられた後、徐々に血清中濃度が上昇し投与後1時間目から6時間目までほぼ一定の値であった。一方、シチコリンを含有する実施例7の製剤投与群では同様に小さい吸収のピークの後、3時間目まで血清中濃度が上昇し、比較製剤3投与群の約2倍の値になった。このことは、手術を施さない正常なラットでも、シチコリンを共存させることにより、ヒトPTHの活性フラグメントの鼻粘膜からの吸収が促進されること

を示している。

#### 【0039】実験例6

参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの18.47ミリグラムを154マイクロリットルの注射用生理食塩水（扶桑薬品）に溶解した。この溶液の5マイクロリットルに注射用生理食塩水95マイクロリットルを加えて混和した（比較製剤4とする）。SD系雄性ラット（8週令）にペントバルビタール（ソムノペンチル、ピットマンムーア社）で軽く麻酔を施し（約0.2ミリリットル/ラット）、実施例8の製剤または比較製剤4の5マイクロリットルをそれぞれ直接片側の鼻腔内に投与した（投与量：30マイクログラム/ラット）。投与方法はマイクロピペット（エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬）の専用のチップを鼻腔に注意深く差し込み投与をおこなった。麻酔から回復後（約1時間弱）は飼育ケージ内で自由に水および餌を摂取させた。経時的に尾静脈より採血し、ヒトPTHの活性フラグメントの血清中濃度を測定した。血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を〔図6〕に示す。比較製剤4投与群（○）では、投与直後に小さい吸収のピークがみられたが、徐々に血清中濃度は低下した。一方、シチコリンを含有する実施例8の製剤投与群（●）では投与直後に吸収のピークがみられた後、投与後2時間目に再びピークが現われ、その後は徐々に血清中濃度は低下した。同じ薬用量のPTH活性フラグメントの皮下投与を基準にして計算されたバイオアベイラビリティはシチコリンを含有する製剤投与群において約100%であった。このことは、手術を施さない正常なラットでも、シチコリンを共存させることにより、ヒトPTHの活性フラグメントの鼻粘膜からの吸収が促進されることを示している。

#### 【0040】実験例7

参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの18.47ミリグラムを154マイクロリットルの注射用生理食塩水（扶桑薬品）に溶解した。この溶液の50マイクロリットルに注射用生理食塩水50マイクロリットルを加えて混和した（比較製剤5とする）。SD系雄性ラット（8週令）にペントバルビタール（ソムノペンチル、ピットマンムーア社）で軽く麻酔を施し（約0.2ミリリットル/ラット）、実施例9の製剤または比較製剤5の5マイクロリットルをそれぞれ直接片側の鼻腔内に投与した（投与量：300マイクログラム/ラット）。投与方法はマイクロピペット（エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬）の専用のチップを鼻腔に注意深く差し込み投与をおこなった。麻酔から回復後（約1時間弱）は飼育ケージ内で自由に水および餌を摂取させた。経時的に尾静脈より採血し、ヒトPTHの活性フラグメントの血清中濃度を測定した。血

21

清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を〔図7〕に示す。比較製剤5投与群(○)では、投与直後に小さい吸収のピークがみられた後、徐々に血清中濃度は低下した。一方、シチコリンを含有する実施例9の製剤投与群(●)では投与直後に吸収のピークがみられた後、投与後2時間目で血清中濃度が再び上昇したが、その後は徐々に血清中濃度は低下した。このことは、手術を施さない正常なラットでも、シチコリンを共存させることにより、ヒトPTHの活性フラグメントの鼻粘膜からの吸収が促進されることを示している。

#### 【0041】実験例8

参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの14ミリigramを350マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の50マイクロリットルに注射用生理食塩水50マイクロリットルを加えて混和した(比較製剤6とする)。SD系雄性ラット(8週令)に麻酔用エーテルで軽く麻酔を施し、実施例10の製剤または比較製剤6の5マイクロリットルをそれぞれ直接片側の鼻腔内に投与した(投与量:100マイクロigram/ラット)。投与方法はマイクロピペット(エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬)の専用のチップを鼻腔に注意深く差し込み投与をおこなった。麻酔から回復後(約15分弱)は飼育ケージ内で自由に水および餌を摂取させた。経時的に尾静脈より採血し、ヒトPTHの活性フラグメントの血清中濃度を測定した。血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を〔図8〕に示す。比較製剤6投与群

(○)では、投与直後に吸収のピークがみられた後、徐々に血清中濃度は低下した。一方、シチコリンを含有する実施例10の製剤投与群(●)では投与直後に吸収のピークがみられた後、投与後2時間目で血清中濃度が再び上昇したが、その後は徐々に血清中濃度は低下した。このことは、手術を施さない正常なラットでも、シチコリンを共存させることにより、ヒトPTHの活性フラグメントの鼻粘膜からの吸収が促進されることを示している。

#### 【0042】実験例9

参考例1に記載の方法に準じて作製したヒトPTHのアミノ基末端から34番目までのアミノ酸からなる活性フラグメントの7.8ミリigramを195マイクロリットルの注射用生理食塩水(扶桑薬品)に溶解した。この溶液の50マイクロリットルに注射用生理食塩水50マイクロリットルを加えて混和した(比較製剤7とする)。SD系雄性ラット(8週令)の頭部を固定して無麻酔下、実施例13の製剤あるいは比較製剤7の5マイクロリットルをそれぞれ直接片側の鼻腔内に投与した(投与量:100マイクロigram/ラット)。投与方法はマイクロピペット(エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬)の専用のチップを鼻腔に注意深く差し込み投与

22

をおこなった。投与後は飼育ケージ内で自由に水および餌を摂取させた。経時的に尾静脈より採血し、ヒトPTHの活性フラグメントの血清中濃度を測定した。血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を〔図9〕に示す。比較製剤7投与群(○)では、投与直後に吸収のピークがみられた後、徐々に血清中濃度は低下した。一方、シチコリンを含有する実施例13の製剤投与群

(●)では投与直後に吸収のピークがみられた後、投与後4時間目で血清中濃度が再び上昇したが、その後は徐々に血清中濃度は低下した。このことは、手術を施さない正常なラットでも、シチコリンを共存させることにより、ヒトPTHの活性フラグメントの鼻粘膜からの吸収が促進されることを示している。

#### 【0043】実験例10

300万国単位(約100マイクロigramに相当)のインターフェロンアルファ2aと5ミリigramのヒト血清アルブミンを含むインターフェロンアルファ製剤(キャンフェロンA300;武田薬品)に1ミリリットルの注射用蒸留水を添加して溶解したものを標準として含量を酵素免疫法で決定したインターフェロンアルファ2aの20ミリigramを注射用生理食塩水の0.5ミリリットルで溶解した。この溶液の50マイクロリットルに注射用生理食塩水の50マイクロリットルを加えて混和した(比較製剤8とする)。SD系雄性ラット(8週令)に麻酔用エーテルで軽く麻酔を施し、実施例14の製剤または比較製剤8の5マイクロリットルをそれぞれ直接片側の鼻腔内に投与した(投与量:100マイクロigram/ラット)。投与方法はマイクロピペット(エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬)の専用のチップを鼻腔に注意深く差し込み投与をおこなった。麻酔から回復後(約15分弱)は飼育ケージ内で自由に水および餌を摂取させた。経時的に尾静脈より採血し、ヒトインターフェロンアルファの血清中濃度を測定した。血清中ヒトインターフェロンアルファ濃度の時間推移を〔図10〕に示す。比較製剤8投与群(○)では、投与2時間後に吸収のピークがみられた後、血清中濃度は低下した。一方、シチコリンを含有する実施例14の製剤投与群(●)では投与2時間後に吸収のピークがみられた後、血清中濃度は低下した。投与2時間後のピーク値はシチコリンを含有する実施例14の製剤投与群のほうが高く、また、インターフェロンアルファの吸収率の指標の一つである時間-血中濃度下面積(AUC)もシチコリンを含有する実施例14の製剤のほうが約1.5倍大きかった。

#### 【0044】実験例11

16.75ミリigramのヒトインスリン(和光純薬)を155.5マイクロリットルの1/10Mクエン酸緩衝液(pH3.5)に分散した。この分散液の50マイクロリットル注射用生理食塩水の50マイクロリットルを加えて混和した(比較製剤9とする)。SD系雄性ラッ

ト(8週令)に麻酔用エーテルで軽く麻酔を施し、実施例15の製剤または比較製剤9の5マイクロリットルをそれぞれ直接片側の鼻腔内に投与した。投与方法はマイクロピペット(エクセルマイデジ8000、D-5、三光純薬)の専用のチップを鼻腔に注意深く差し込み投与をおこなった。麻酔から回復後(約15分弱)は飼育ケージ内で自由に水および餌を摂取させた。経時的に尾静脈より採血し、ヒトインスリンの血清中濃度を測定した。血清中ヒトインスリン濃度の時間推移を〔図11〕に示す。比較製剤9投与群(○)では、投与直後に高い血清中濃度がみられた後、血清中濃度は低下した。一方、シチコリンを含有する実施例15の製剤投与群(●)でも投与直後に高い血清中濃度がみられた後、血清中濃度は低下したが、全ての観察時間にわたって比較製剤投与群よりも高い値であり、シチコリンを含有させることにより、インスリンの吸収が増大していることが明らかとなった。

## 【0045】

【発明の効果】生理活性を有するペプチドまたは蛋白質とシチジンヌクレオチド誘導体とを含有する本発明の経粘膜用製剤は、粘膜に障害性を示すことなく、該生理活性ペプチドあるいは蛋白質を鼻粘膜、消化管粘膜、肺粘膜あるいは腔粘膜等からの吸収を増大させうる。

## 【0046】

## 【配列表】

配列番号(SEQ ID NO): 1

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 34

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸(amino acid)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状(linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): ペプチド(peptide)

配列の特徴(FEATURE)

存在位置(LOCATION): 1

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Ser または Aib \*

配列(SEQUENCE DESCRIPTION):

Xaa Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Xaa Xaa Xaa His Leu Asn

1 5 10 15

Ser Xaa Xaa Arg Xaa Glu Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Leu Gln Asp Val His

20 25 30

Asn Xaa

## 【0047】配列番号 (SEQ ID NO): 2

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH): 34

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸(amino acid)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状(linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): ペプチド(peptide)

配列の特徴(FEATURE)

存在位置(LOCATION): 3

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Ser または炭素数

4以下のD-α-アミノ酸存在位置(LOCATION): 16

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=水溶性α-アミノ酸※

配列(SEQUENCE DESCRIPTION):

\*存在位置(LOCATION): 8

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Met または脂溶性天然アミノ酸

存在位置(LOCATION): 11

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Leu, Ser, Lys または芳香族アミノ酸

存在位置(LOCATION): 12

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Gly または D-アミノ酸

存在位置(LOCATION): 13

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Lys または Leu

存在位置(LOCATION): 18

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Met または脂溶性天然アミノ酸

存在位置(LOCATION): 19

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Glu または塩基性アミノ酸

存在位置(LOCATION): 21

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Glu または塩基性アミノ酸

存在位置(LOCATION): 23

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Trp または 2-(1,3-ジ フォスホ-2-イル)Trp

存在位置(LOCATION): 25

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Arg または His

存在位置(LOCATION): 26

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Lys または His

存在位置(LOCATION): 27

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Lys, Gln または Leu

存在位置(LOCATION): 34

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Phe または Phe-NH<sub>2</sub>

40※存在位置(LOCATION): 25

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=水溶性α-アミノ酸

存在位置(LOCATION): 26

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=水溶性α-アミノ酸

存在位置(LOCATION): 27

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=水溶性α-アミノ酸

存在位置(LOCATION): 34

他の特徴(OTHER INFORMATION): Xaa=Phe または Phe-NH<sub>2</sub>

25 26

Ser Val Xaa Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Xaa

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Xaa Xaa Xaa Leu Gln Asp Val His

20 25 30

Asn Xaa

【図面の簡単な説明】

【図1】血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を示す。

【図2】血清中ヒトPTH濃度の時間推移を示す。

【図3】血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を示す。

【図4】血清中ヒトPTH濃度の時間推移を示す。

【図5】血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を示す。

【図6】血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を示す。

【図7】血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を示す。

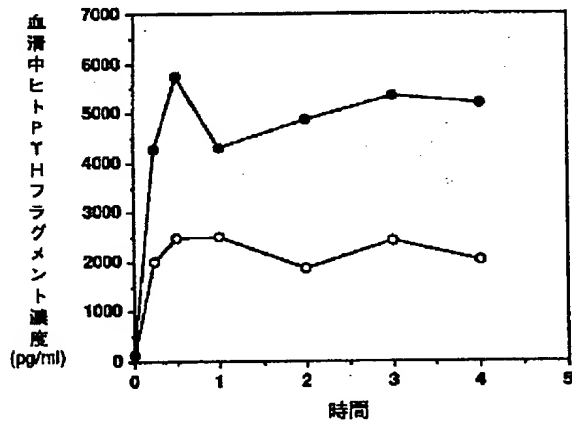
【図8】血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を示す。

【図9】血清中ヒトPTH活性フラグメント濃度の時間推移を示す。

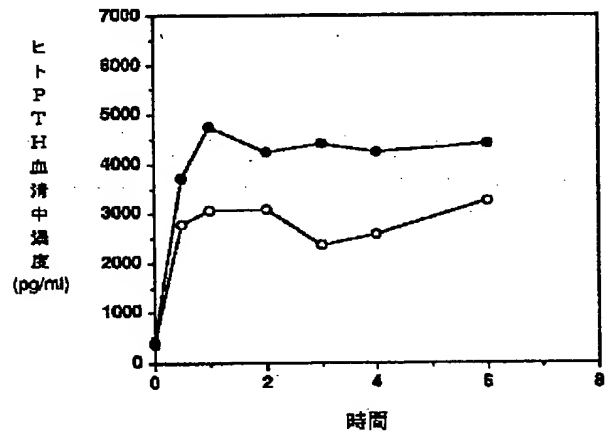
【図10】血清中ヒトインターフェロンアルファ濃度の時間推移を示す。

【図11】血清中ヒトインスリン濃度の時間推移を示す。

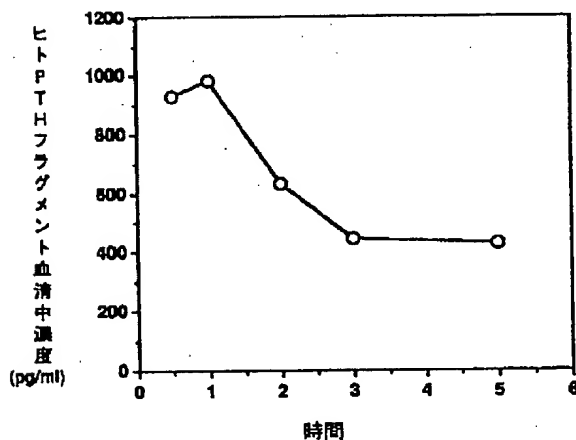
【図1】



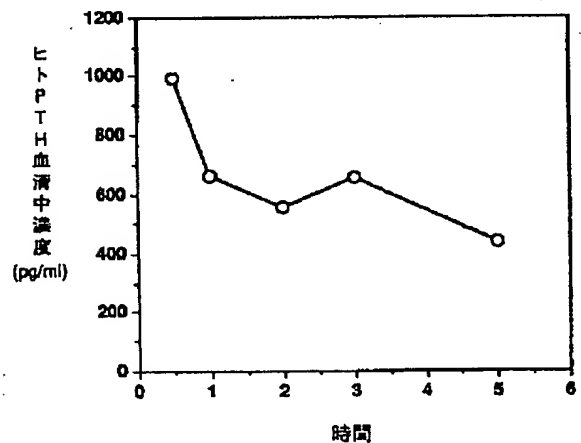
【図2】



【図3】

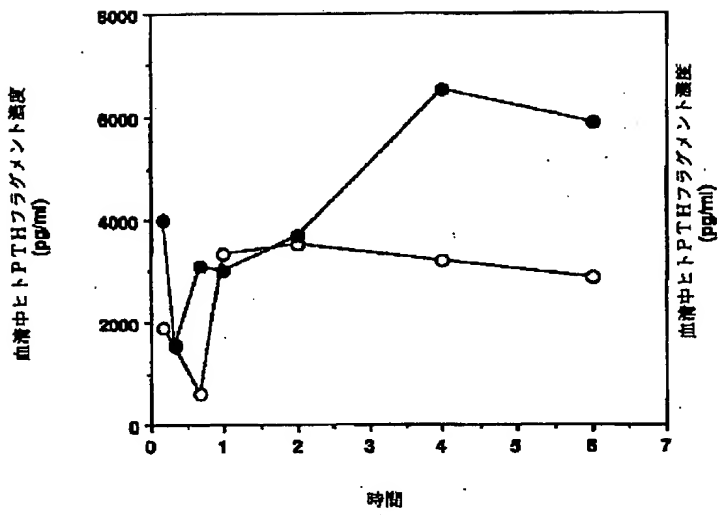


【図4】

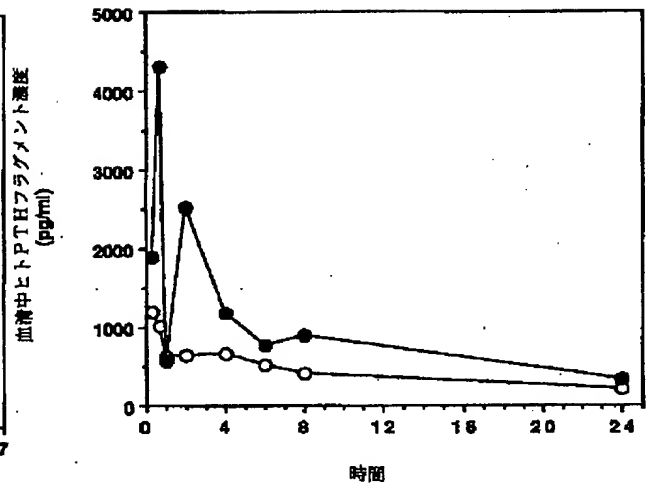




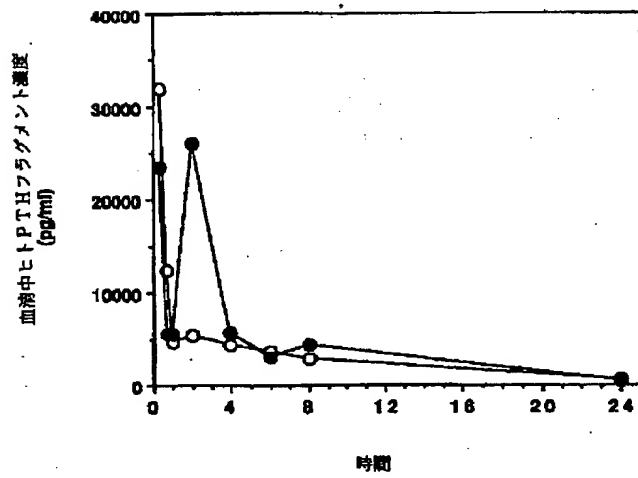
【図5】



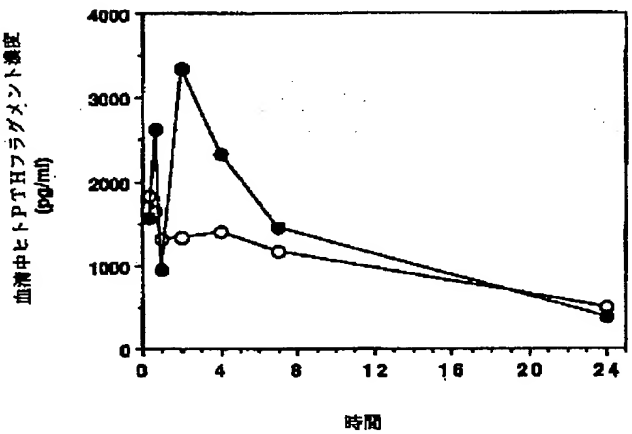
【図6】



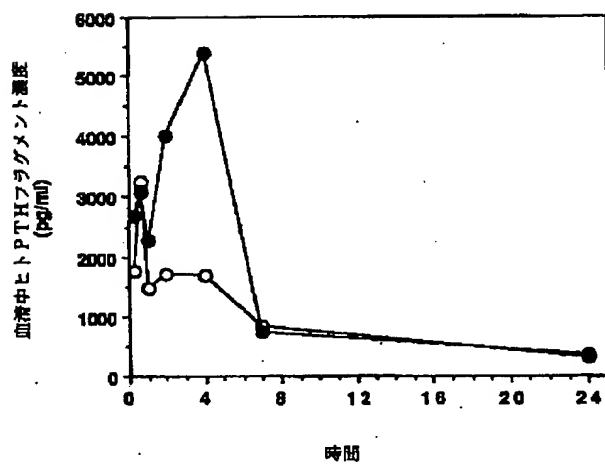
【図7】



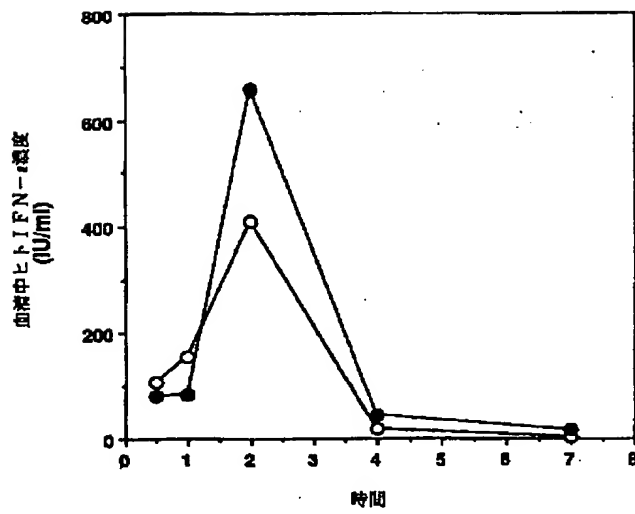
【図8】



【図9】



【図10】



【図11】

